

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AF

(11)Publication number : 2000-053581  
(43)Date of publication of application : 22.02.2000

(51)Int.CI. A61K 38/00  
A61K 38/16  
// A61K 35/16

(21)Application number : 11-197459 (71)Applicant : ZLB ZENTRALLAB BLUTSPENDEDIENST

SLK

(22)Date of filing : 12.07.1999 (72)Inventor : FOERTSCH VERENA  
REICHEN KURT  
LERCH PETER G

(30)Priority

Priority number : 98 19831061 Priority date : 10.07.1998 Priority country : DE

## (54) PRODUCTION OF PROTEIN PREPARATION HAVING DECREASED COAGULATE CONTENT AND USE OF THE PREPARATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a protein preparation having improved safety, compatibility and biological activity of protein by separating and removing a coagulum existing in the protein preparation before or after thermal treatment.

SOLUTION: The content of coagulum in a protein preparation is decreased by separating the coagulum, denatured protein and/or contaminant existing in the protein preparation before and/or after thermal treatment. The protein preparation is preferably a plasma protein preparation such as a preparation of a plasma protein selected from plasma protein fractions containing proteins such as plasminogen, albumin, factor VIII, immunoglobulin and (apo)lipoprotein. The thermal treatment is preferably carried out by heating the protein preparation at  $\geq 55^{\circ}\text{ C}$  for  $\geq 5$  hr to sufficiently remove the infectious contaminants. The separation process preferably contains a precipitation process, a gel- filtration process, a microfiltration process, or the like.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-53581

(P2000-53581A)

(43)公開日 平成12年2月22日 (2000.2.22)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
A 6 1 K 38/00  
38/16  
// A 6 1 K 35/16

識別記号

F I  
A 6 1 K 37/02  
35/16  
37/04

テマコード\*(参考)

審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平11-197459  
(22)出願日 平成11年7月12日 (1999.7.12)  
(31)優先権主張番号 19831061.7  
(32)優先日 平成10年7月10日 (1998.7.10)  
(33)優先権主張国 ドイツ (D E)

(71)出願人 599097407  
ツエットエルバー ツエントラールラボラ  
トリウム ブルートシュベンデディーンス  
ト エスエルカー  
スイス国 ベルン 22 ヴァンクドルフシ  
ュトラーゼ 10  
(72)発明者 フェレナ フエルチュ  
スイス国 オルテン ヘーエンシュトラー  
セ ヴエスト 37  
(72)発明者 クルト ライヒエン  
スイス国 エシ イム ヒエール 62  
(74)代理人 100061815  
弁理士 矢野 敏雄 (外3名)  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 減少した凝集物含量を有するタンパク質製剤の製造法および該製剤の使用

(57)【要約】

【課題】 タンパク質の安全性、相容性および生物活性  
が改善されている、減少した凝集物含量を有する医療用  
のタンパク質製剤の、経済的かつ簡単に使用されうる製  
造法の提供。

【解決手段】 热処理前および/または热処理後、タン  
パク質製剤中に存在する凝集物、変性したタンパク質お  
よび/または汚染物の分離を行う。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 熱処理を含む、減少した凝集物含量を有するタンパク質製剤の製造法において、熱処理前および／または熱処理後、タンパク質製剤中に存在する凝集物、変性したタンパク質および／または汚染物の分離を行うことを特徴とする、減少した凝集物含量を有するタンパク質製剤の製造法。

【請求項 2】 血漿タンパク質の製剤を製造する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 血漿タンパク質を、プラスミノゲン、アルブミン、第VIII因子、第IX因子、フィブロネクチン、免疫グロブリン、キニノーゲン、アンチトロンビンIII、 $\alpha$ -1-アンチトリプシン、プレカリクリエン、フィブリノーゲン、トロンビン、(アポー)リボタンパク質、および1つまたは複数のこれらのタンパク質を含有する血漿タンパク分画からなる群から選択する、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】 アルブミン、免疫グロブリンまたは(アポー)リボタンパク質の製剤を製造する、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】 化学的に変性されたタンパク質の製剤を製造する、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】 化学的変性を、ポリエチレングリコール変性、ヨウ化、アシル化、酸化、ニトロキシル化、および交差架橋からなる群から選択する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 感染性汚染物を少なくとも十分に除去するため、熱処理が、タンパク質製剤を少なくとも 55°C に十分な時間に亘って加熱することを含む、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】 热処理時間が少なくとも 5 時間である、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】 热処理を安定剤の存在下に実施する、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】 分離が沈殿工程を含む、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】 沈殿を、硫酸アンモニウム、エタノールまたはポリエチレングリコールを添加することによって行う、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 分離がゲル濾過工程を含む、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】 分離が微小濾過を含む、請求項 1 から 12 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】 分離が膜濾過を含む、請求項 1 から 13 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】 膜濾過のため、30~1000 kD の排除尺度を選択する、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】 分離の前に前処理工程を実施し、その際にタンパク質製剤中に存在する凝集しうる成分および

／または変性しうる成分を、分離可能な状態に移行させる、請求項 1 から 15 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】 前処理工程が、タンパク質製剤中の物理化学的パラメーターの変化を含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】 物理化学的パラメーターの変化が、pH 値の変化、温度上昇、イオン強度または誘電率の変化、剪断力の導入、またはこれらの方の 2 つまたはそれ以上の組合せを含む、請求項 17 記載の方法。

10 【請求項 19】 タンパク質製剤の温度を上昇させる、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】 タンパク質製剤を 30 分~4 時間に亘って 40~70°C の温度に加熱する、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】 タンパク質製剤を 1 時間~2.5 時間に亘って 45~65°C の温度に加熱する、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】 減少した凝集物含量を有する医療用タンパク質製剤を製造するための、請求項 1 から 21 までのいずれか 1 項記載の方法の使用。

【請求項 23】 凝集物含量が、分離工程を用いないタンパク質製剤に対して、少なくとも約 10% 減少されている、請求項 22 記載の使用。

【請求項 24】 凝集物含量が少なくとも約 50% 減少されている、請求項 23 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、減少した凝集物含量を有するタンパク質製剤を製造するための方法、殊に血漿タンパク質、例えばアルブミンの医療用製剤を製造するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒトの血漿タンパク質は数十年来大規模に清浄化され、かつ治療および予防のために普及されている。純粋なタンパク質からなる製剤、または 1 つの複合した血漿混合物からのタンパク質分画からなる製剤には、種々の方法、例えば選択的沈殿作用による分画、またはクロマトグラフィー法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過および親和性クロマトグラフィーによるタンパク質混合物の分離が使用されてよい。最適な結果が得られるように、これらの方法は極めて頻繁に組み合わせも行われる。

【0003】 大規模な血漿タンパク質の分画には、久しくエタノールを用いた沈殿法も認められていた(コーン (Cohn) 他、J. Am. Chem. Soc. 68 (1946), 459~475 頁; Kistler und Nitschmann, Vox Sang. 7 (1962), 414~424 頁)。現在もなお、この方法を用いて世界的に大量の血漿タンパク質、特にアルブミン、免疫グロブリンおよび血液凝固因子、ひいては他のタンパク質が、ヒトの血漿から、特に医療用の目的で単離されている。しかし、血

漿タンパク質のエタノール分画は、いくつかの欠点を有する。すなわち、殊に高いアルコール濃度および／または高い温度の場合、不安定なタンパク質の部分的な変性が行われることがある。このような変性は、部分的または完全に、生理的機能の損失をもたらすか、または構造的な変化をもたらし、これは前酵素の活性化において、または新規の抗原決定基またはタンパク質凝集物の形成として現れることがある。

【0004】考えられる感染性汚染物、例えばウイルスまたは他の病原体を、失活させるため、血漿製剤を遮断性の低温殺菌工程にかけることができる。アルブミンは例えれば、安定剤、例えればN-アセチルトリプトファンエトまたはナトリウムカブリレートの存在下に、60～64°Cに10時間で加熱することによって、低温殺菌されることができる（ゲリス（Gellis）他、J. Clin. Invest. 27(1948), 239～244頁）。他の低温殺菌法は、例えれば米国特許第2897123号；同第3227626号；同第4379085号；同第4440679号；同第4623717号および4803073号明細書中に開示されている。血漿タンパク質の低温殺菌された製剤は、ウイルスおよび病原体の伝染に関連して、極めて安全であることが判明した。低温殺菌の他の利点は、タンパク質製剤に毒性の添加物質が添加されることはならず、したがって多くの場合、最終容器中の病原体の失活が生じうることである。しかし、低温殺菌の欠点は、しばしば明らかな凝集物形成の増大が見られることである。

【0005】しかし部分的に多量の、見ることができるか、またはほぼ見ることができる粒子の発生をもたらす前記の凝集物形成は、殊に医学的使用および薬学的使用の場合、著しく不都合である。すなわち、粗大粒子は直接毛細管の機能を損なうことがある。ほぼ見ができる粒子またはタンパク質凝集物の不都合な副作用は、多種多様のタンパク質処方物にとって公知であり、かつ記載されている。したがって多くの場合に認可を与える当局は、例えればアルブミン溶液または免疫グロブリン溶液の凝集物含量に関する境界値を主張する。免疫グロブリン溶液中の凝集物は、例えれば補体系の制御されない活性化を引き起こし、かつ重大な副作用をもまねく。アルブミン凝集物については、極めて迅速に循環から消滅し、おそらくRES系を遮断し、かつ組織体をショック状態に対して敏感にすることが記載されている。したがって、タンパク質溶液中の凝集物は極端な場合、どんな事情があっても回避されなければならない生命に関わる状況を招きうる。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】血漿タンパク質の極めて広い使用範囲により、タンパク質の安全性、相容性および生物活性が改善されうるような方法への極めて高い需要がある。付加的に、このような方法は経済的かつ簡単に使用されうるべきである。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】驚くべきことに、本発明によれば、例えれば考えられる感染性汚染物を除去するため実施される熱処理が、予め行われるか、または後で行われる分離工程によって改善される場合、減少した凝集物含量を有するタンパク質製剤が製造されることができ、その結果、最終生成物中では変性および／または凝集物形成は傑出して減少されているか、または阻止されていることが確認された。引続き熱処理されるべきであるタンパク質またはタンパク質混合物は、分離工程により所望の活性作用物質および天然作用物質に関連して増量される。したがって本発明の対象は、熱処理を含む、減少された凝集物含量を有するタンパク質製剤を製造するための方法であり、この場合、この方法は熱処理の前および／または後に、タンパク質製剤中に存在する凝集物、変性したタンパク質および／または汚染物の分離を行うことによって特徴付けられる。

#### 【0008】

【発明の実施の形態】本発明による方法は、殊に血漿タンパク質の製剤を製造するために適しているが、しかしそれに限定されるものではない。血漿タンパク質は、有利にプラスミノゲン、アルブミン、第VIII因子、第IX因子、フィブロネクチン、免疫グロブリン、キニノーゲン、アンチトロンビンIII、 $\alpha$ -1-アンチトリプシン、プレカリクレイン、フィブリノーゲン、トロンビン、（アポー）リボタンパク質、および1つまたは複数のこれらのタンパク質を含有する血漿タンパク分画からなる群から選択される。特に好ましくは、アルブミン、免疫グロブリンまたは（アポー）リボタンパク質からなる製剤、および最も好ましくはアルブミン製剤が製造される。

【0009】本発明による方法によって製造された、減少した凝集物含量を有するアルブミン製剤は、医学的使用のためには公知技術水準の調製物よりも、傑出して良好である。本発明によるアルブミン製剤は、血漿増量剤として使用されてよいか、あるいは熱傷の場合の治療にも使用されることができる。その上、殊にわずかな濃度の高活性タンパク質またはペプチド、例えれば今日ではしばしば組み換え技術を用いて製造されるホルモン、ケモキシン（Chemokine）、サイトカインまたは酵素が重要である場合には、他の使用、例えれば超音波画像または、安定剤としてタンパク質溶液への添加も可能である。

【0010】特に本発明による方法は、化学的に変性されたタンパク質の製剤の製造にも適当であり、この場合、タンパク質の官能基、殊に官能側鎖の変性が実施される。化学的に変性されたタンパク質、例えればアルブミンは、例えば、生体内で所望の組織区分中には到達しないか、または遊離した形では望ましい活性を有していない官能分子の担体として、使用されてもよい。有利に化学的変性は、ポリエチレングリコール変性、ヨウ化、ア

シル化、例えばアセチル化、例えば過酸化物を用いた酸化、ニトロキシル化および、例えば二感応性リンカーを用いた交差架橋からなる群から選択される。

【0011】本発明による方法にとって本質的な工程、すなわち熱処理前および／または熱処理後の凝集物、変性したタンパク質および／または汚染物の少なくとも部分的な分離は、公知の方法により、例えば遠心分離による、沈殿した凝集物の分離と接続している、例えば硫酸アンモニウム、エタノールまたはポリエチレングリコールを用いた沈殿を含んでいてよい。その上、分離は、例えばフラクトゲル(Fractogel) EMD Bio SEC(メルク(Merck))または他のゲル濾過媒体、例えばセファデックス(Sephadex)またはセファローズ(Sephadose)(ファルマシア(Pharmacia))を用いたゲル濾過も含んでいてよい。しかし有利に、分離は膜に適した孔径度、例えば30～1000kDおよび殊に100～500kDの排除尺度(Ausschlussgroesse)の使用下に膜濾過によって行われ、この場合、排除尺度を上回る分子量を有する望ましくない成分は分離される。さらに分離には、例えばウイルスの減損のために、例えば濾過材料DV20またはDV50(Pall Corp., ニューヨーク、U.S.A.在)またはプラノバ(Planova)15N(Asaki、東京、日本在)の使用下に使用される微小濾過(Nanofiltration)も、含まれてよい。

【0012】分離前、または有利に分離後に実施される熱処理には、有利に長時間に亘る温度上昇、例えば公知の方法で行われてよい低温殺菌工程が含まれる。常法によれば熱処理は、感染性汚染物を少なくとも十分に失活させるため、タンパク質溶液を少なくとも55°Cに十分な時間で加熱することを含む。加熱時間は有利に少なくとも5時間、特に好ましくは約10時間である。加熱の際の温度は、有利に60～65°Cの範囲内にある。タンパク質の失活を阻止するため、アルブミンの場合には熱処理は有利に公知の安定剤、例えばN-アセチルトリプトファンまたはナトリウムカプリレートの存在下に実施される。

【0013】多くのタンパク質混合物の場合、前記の分離工程が既に凝集物、変性したタンパク質および／または汚染物の形成の本来十分な減少を生じさせるけれども、他の場合には所望の結果は、分離前にタンパク質製剤中に存在する、凝集しうるか、および／または変性しうる成分が分離可能な状態に移行されるような前処理工程が実施されることによってのみ得ることができる。有利に前処理工程は、製剤中に既に存在する変性された分子、部分的に変性された分子または敏感な分子、または汚染物を凝集させるか、または他の方法で、引続く分離工程を用いて除去ができる状態にもたらされるため、タンパク質製剤中の物理化学的パラメーターの変化、殊に応力処理を含む。この物理化学的パラメーターの変化は、例えばpH値の変化、温度の変化、殊に上

昇、イオン強度または誘電率の変化、剪断力の導入、またはこれらの2つまたはそれ以上の中の組合せを含んでいてよい。

【0014】特に有利に、この前処理工程はタンパク質製剤の温度上昇を含む。この温度上昇の程度および時間は、その都度のタンパク質製剤もしくはその敏感性に依存する。一方では、できるだけ大部分の凝集しうる成分を分離可能な状態へと移行させるため、温度上昇およびその時間は十分であるべきであるが；他方では、望まれる製剤中のタンパク質の失活をできるだけ十分に阻止するため、条件は過度に激烈に選択されなければならない。多數のタンパク質、例えばアルブミンに関しては、タンパク質製剤を40～70°C、殊に45～65°Cの温度に、30分ないし4時間、殊に1時間ないし2.5時間にわたって加熱することが有効であることが判明した。

【0015】最後に本発明はなお、本発明による方法によって製造された、減少した凝集物含量を有するタンパク質製剤にも関する。このタンパク質製剤は、殊に医学的使用に関して、公知技術水準の製剤よりも著しく好適であり、それというのも、本発明によるタンパク質製剤が医療用の使用の際に著しく少ない非相容性反応を生じるからである。

【0016】最後に、さらに次の例につき本発明を詳説する。

#### 【0017】

##### 【実施例】例1

アルブミン溶液(10ミリモル／lのNaCl中で10%)を45°Cで90分間インキュベートした。引続き、300kDの分子量カットオフを有するカセットを通してダイアフィルトレーションした(diafiltrieren)。主にモノマーアルブミンを含有する限外濾液は、安定剤(16ミリモル／lのNa-カプリレート、16ミリモル／lのアセチルトリプトファン)の存在下に、60°Cで10時間低温殺菌した。

【0018】結果：凝集物含量は、前インキュベート後2%、限外濾過後(限外濾液)中で0.1%を上回り、および低温殺菌後0.6%であった。限外濾過の残留物中では、凝集物の著しい増量が測定された(80%を上回る)。前インキュベーションおよび引き続くダイアフィルトレーションなしで低温殺菌後、6%の凝集物含量が測定された。結果は、アルブミンの前インキュベーション中に安定剤(N-アセチルトリプトファンまたはナトリウムカプリレート)を添加することによって本質的に影響を及ぼされたわけではない。

【0019】同様の試験を、商業的に入手できるアルブミン溶液(140ミリモル／lのNaCl、12ミリモル／lのN-アセチルトリプトファンおよびNa-カプリレート中20%)を用いて実施した。実験中の溶液の挙動および結果は、出発材料としてのアルブミン溶液10%と本質的に同一であった。

【0020】溶液中の凝集物の測定：高性能ゲルfiltrationにより、pH 7.0、7.0ミリモル/のリン酸カリウム-緩衝剤中スペローズ(Superose)HR 10/30カラム(ファルマシア(Pharmacia))上で、1.0ml/分の流れを用いて、タンパク質1mgを分離した。280nmの場合に吸収を測定することによって、検出を行った。試験体のモノマー含量もしくは凝集物含量を、タンパク質ピークの平面を介して計算した。

【0021】例2

アルブミン溶液(10%、それぞれ8ミリモル/の安定剤を含有する)を、1モル/のNaOHを用いてpH 10.5に調節し、引続き、65°Cで2時間加熱した。その後、溶液を室温に冷却し、1モル/のHClを用いてpH値を7に逆滴定した。

【0022】選択的沈殿により、形成された凝集物を次のように除去した：

(a) 溶液に、25%、30%または35%の飽和に至

るまで硫酸アンモニウムを添加した。その後生じる混濁を、遠心分離により除去し、かつ残滓をゲルfiltrationによりセファデックス(Sephadex)G-25(PD-10、ファルマシア(Pharmacia))上で、150ミリモル/のNaCl中で再平衡化した。引続き、安定剤(Na-カブリレート、N-アセチルトリプトファンート、それぞれ8ミリモル/)の存在下に、60°Cで10時間低温殺菌した。

【0023】(b) 溶液に、6.1%、7.1%または10.3%の最終濃度になるまで、ポリエチレン glycol(PEG)3000を添加し、およびこれに起因する混濁を遠心分離により除去した。引続き、残滓を(a)と同様に再平衡化し、かつ最終生成物を取得するため安定剤の存在下に低温殺菌した。

【0024】結果：

【0025】

【表1】

		最終生成物中の凝集物含量	対照に対する凝集物含量の減少率%
前処理を用いないアルブミン(対照)		22.9	
硫酸アンモニウム	25%	15.8	31
	30%	3.7	84
	35%	2.8	88
PEG	6.1%	20.5	10
	7.1%	16.8	27
	8.3%	9.3	59

【0026】例3

PEGの活性化：塩化シアヌール5.5gを、炭酸ナトリウム10gを含有する無水ベンゾール400ml中に溶解した。PEG 1900 19gを混合物に添加し、室温で一晩中攪拌した。溶液をfiltrationし、石油エーテル600mlをゆっくり添加した。懸濁液をfiltrationし、かつ沈殿物をベンゾール400ml中に溶解した。遊離塩化シアヌールを除去するため、沈殿工程およびfiltration工程を、数回繰り返した。

【0027】アルブミンでの活性化したPEGの形成：pH 9.2、0.1モル/のテトラホウ酸ナトリウム100ml中にアルブミン1gを溶解した。4°Cで、活性化したPEG 8gを添加し、かつpH値を1時間の間9.2に維持した。このように第1アミノ基80~90%をPEGを用いて変性した。反応後ダイアフィルトレーション(10kD遮断膜)により過剰のPEGを除去し、かつ10ミリモル/のNaClに対して溶液を再緩衝させた。引続き、溶液を例1の場合と同様に45°Cで前インキュベートし、300kDカセットを通してダイアフィルトレーションし、安定剤の存在下に60°Cで10時間低温殺菌した。

【0028】結果：前インキュベーションなしで、PEG変性されたアルブミン中で10%の凝集物含量が測定された。前インキュベーションおよび引き続くダイアフィルトレーションによって、凝集物含量は4.5%に低減することができた。

【0029】例4

20%のアルブミン溶液を、pH 9.5、0.1モル/のホウ酸塩緩衝剤を用いて、10%に希釈し、かつ0°Cに冷却した。引続き、20% (v/v) の冷えたKJ3溶液を添加し、0°Cで30分インキュベートした。NaSO<sub>3</sub>(1モル/)数滴を添加することによって、反応を停止し、タンパク質溶液を60°Cで2時間インキュベートし、かつ冷却した。一定部分を60°Cで8時間インキュベートした(凝集物形成の判定のため)。

【0030】溶液の残りを、300kD膜を介して、140ミリモル/のNaCl 4.5回量に対してダイアフィルトレーションした。最後に、残留物を20%のタンパク質濃度に蒸発濃縮した。限外濾液を、10kDのダイアフィルトレーションにより再緩衝した：140ミリモル/のNaCl 10回量に対するダイアフィルトレーション、および引続き15~20%のタンパク

質含量への10kDaダイアフィルトレーション膜での濃縮。生じるタンパク質溶液を、例1の場合のように、安定剤の存在下に低温殺菌した。

【0031】前処理（前インキュベーション、300kDダイアフィルトレーション）を用いて、ヨウ化したアルブミン中では5.2%の凝集物含量が達成され、前処理なしでは、12.7%の凝集物含量が測定され、すなわち約5.9%の低減が達成されることができた。

#### 【0032】例5

アルブミン（20%）を、pH7.5の飽和したNa-アセテート溶液を用いて1:2に希釈し、0°Cに冷却した。1時間で、無水酢酸を分けて添加した（はじめ装入したタンパク質と同一の重量）。引続き、pH値を7.5に調節し、試験体を1.2μmのフィルターを通して濾過し、かつ10kDのダイアフィルトレーションにより再緩衝した（140ミリモル/1のNaCl 30回量に対して）。

【0033】タンパク質溶液を、60°Cで2時間インキュベートし、次に冷却し、かつ300kD膜を介して、140ミリモル/1のNaCl 4回量に対してダイアフィルトレーションした。最後に、残留物を約20%に蒸発濃縮した。限外濾液を、10kDのダイアフィルトレーションにより再緩衝し（150ミリモル/1のNaCl 10回量に対するダイアフィルトレーション）、および15~20%のタンパク質含量へと同一膜で濃縮した。引続き、アセチル化したアルブミンの溶液を、例1の場合のように、安定剤の存在下に低温殺菌した。

【0034】前処理（前インキュベーション、300kD、ダイアフィルトレーション）を用いて、最終生成物中では、6.2%の凝集物含量を測定し、前処理なしでは、アセチル化した生成物がゲル化し、すなわち可溶性タンパク質はもはや存在しなかった。

#### 【0035】例6

0.5ミリモル/1のEDTAを有するアルブミン溶液（10%）を、0.1モルの過クロロ酸を用いてpH3.2に調節し、かつ30°Cに加熱した。タンパク質溶液に、0.5ミリモル/1のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した。引続き、30°Cで2時間インキュベートした。インキュベーション後、140ミリモル/1のNaCl 4回量に対して10kDのダイアフィルトレーションを行った。残留物を300kD膜を介して、140ミリモル/1のNaCl 2回量に対してダイアフィルトレーションし、最後に、残留物を15~20%のタンパク質濃度に蒸発濃縮した。

【0036】限外濾液を、10kDのダイアフィルトレーションにより再緩衝し（140ミリモル/1のNaCl 10回量）、および同一膜で10~15%のタンパク質含量へと濃縮した。引続き、酸化したアルブミンの溶液を、例1の場合のように、安定剤の存在下に低温殺菌した。

【0037】前処理（300kDダイアフィルトレーション）を用いて、最終生成物中では1.1%の凝集物含量が測定された。前処理なしでは、酸化したアルブミンは11.1%の凝集物含量を有した。したがって、凝集物含量は約90%低減することができた。

#### 【0038】例7

アルブミン溶液（10%、20ml）を、NaOHを用いてpH8.5~9.0に調節した。その上、トリエタノールアミン2ml中に懸濁したジメチルスベリミダート50mgをpH9.7で添加し、かつ室温で2時間インキュベートした。pH8.5、0.1モル/1のトリス10%（v/v）を添加することによって、反応を停止させた。引続き、タンパク質溶液を60°Cで2時間インキュベートし、その後冷却した。この溶液15mlを、300kD膜を介して、ダイアフィルトレーションした（140ミリモル/1のNaCl 12回量に対して）。最後に、残留物をできるだけ高濃度に蒸発濃縮した。

【0039】限外濾液を、10kDのダイアフィルトレーションにより140ミリモル/1のNaCl 30回量に対して再緩衝し、引続き、140ミリモル/1のNaClに対する真空透析により、15~20%のタンパク質含量へと濃縮した。引続き、架橋剤によって変性されたアルブミン溶液を、例1の場合のように、安定剤の存在下に低温殺菌した。

【0040】前処理（インキュベーション、300kDダイアフィルトレーション）を用いて、最終生成物中では2.5%の凝集物含量が測定された。前処理なしでは、変性されたアルブミンは20.5%の凝集物含量を有した。したがって、凝集物含量は約88%低減することができた。

#### 【0041】例8

アルブミン溶液（タンパク質10%、エタノール10%中）に、4-（2-ブロムアセトアミド）-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシ（BrAcTPO；エタノール中に溶解、500mg/ml）を添加した（BrAcTPO 0.177g/gタンパク質）。溶液を45°Cに加熱し、pH値をNaOHを用いて9.5に調節し、苛性アルカリ溶液を連続的に添加することによって、2~3時間この数値に維持した。引続き、HClを用いてpH値を7.2に逆滴定し、溶液を60°Cに90分加熱した。その後、140ミリモル/1のNaCl 15回量を用いて300kDダイアフィルトレーションを行った。限外濾液を、10kD、140ミリモル/1のNaCl 5~10回量を用いてダイアフィルトレーションし、および最後に同一膜で20%のタンパク質含量へと、濃縮した。溶液を、例1の場合のように、安定剤の存在下に低温殺菌した。

【0042】前処理（インキュベーション、300kDダイアフィルトレーション）を用いて、ポリニトロキシ

ル化したアルブミン中では0.1%の凝集物含量が測定された。前処理なしでは、変性されたアルブミンは5.5%の凝集物含量を有した。したがって、凝集物含量は90%を上回って低減されることができた。

【0043】例9

アポリポタンパク質A-1の溶液(10g/l、10ミリモル/NaCl中)を、pH5.0で、60°C、2時間でインキュベートした。引続き、pH値を7.5に調節し、グアニジン-HClを2モル/lの濃度になるまで添加し、かつ45°Cで2時間インキュベートした。この溶液を、300kD膜を介してダイアフィルトレーションし(10ミリモル/lのNaCl、10回量)、引き、10kD膜を用いてダイアフィルトレーションし、かつ10g/lに濃縮した。

【0044】前処理なしでは(4試験)、アポリポタンパク質A-1溶液中で2.4%~5.4%の凝集物含量が測定され、前処理を用いて(3試験)、凝集物含量は0.4~0.8%に低減されることができた。

【0045】例10

免疫グロブリンGの溶液(20g/l、3ミリモルNaCl中)

を、pH7.0、45°Cで12時間インキュベートした。凝集物の含量は、前処理中に0.1未満~1.0%に上昇した。引き、アクリルゲル(セファリル(Sepharyl)S-300HR)を介してゲルfiltrationし、pH値をHClを用いて5.3に調節し、かつ10kD膜を用いて120g/lに濃縮した。凝集物含量は0.2%であり、かつ6ヶ月に亘る貯蔵の間37°Cで安定したままであった。処理されていない比較溶液中では、含量は同一条件下で0.8%に上昇した。

【0046】

【発明の効果】本発明による方法は、特に減少した凝集物含量を有する医療用のタンパク質製剤を製造するためには好適である。有利に凝集物含量は、分離工程を用いない1つのタンパク質製剤ー他の場合には同一のタンパク質製剤ーに対して少なくとも約10%、特に好ましくは少なくとも約30%、および最も好ましくは少なくとも約50%減少される。場合によっては、むしろ約90%またはそれ以上の凝集物含量の減少が達成される。

---

フロントページの続き

(72)発明者 ペーター ゲーレルヒ  
スイス国 ベルン ローゼンヴェーク 20